Introdução à Microscopia

Fabiana Silva Vieira

São Cristóvão/SE
2008

Introdução à Microscopia

Elaboração de Conte do
Fabiana Silva Vieira

Projeto Gráfico
Neverton Correia da Silva
Nycolas Menezes Melo

Capa
Hermeson Menezes

ia ra   ação
Nycolas Menezes Melo

Ilustração
Manuel Messias de Albuquerque Neto

FICHA CATALOGRÁFICA PRODUZIDA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

V658i Vieira, Fabiana Silva.
Introdução à Microscopia. Fabiana Silva Vieira - São Cristóvão: Universidade Federal de Sergipe - CESAD, 2008.

1. Microscopia. I. Título.

CDU 543.456

Sumário

Aula 1

MICROSCÓPIO ÓPTICO:
CONSTITUINTES

META

Abordar os princípios básicos da microscopia óptica.

OBJETIVOS

Ao final desta aula, o aluno deverá:
entender a definição de tecidos;
enentender o mecanismo de obtenção de imagens pelo microscópio óptico;
reconhecer as partes do microscópio óptico e o seu funcionamento.

PRÉ-REQUISITO

O aluno deverá acessar o site http://www.invivo.fiocruz.br/celula/historia_10.htm para conhecer a história da microscopia.

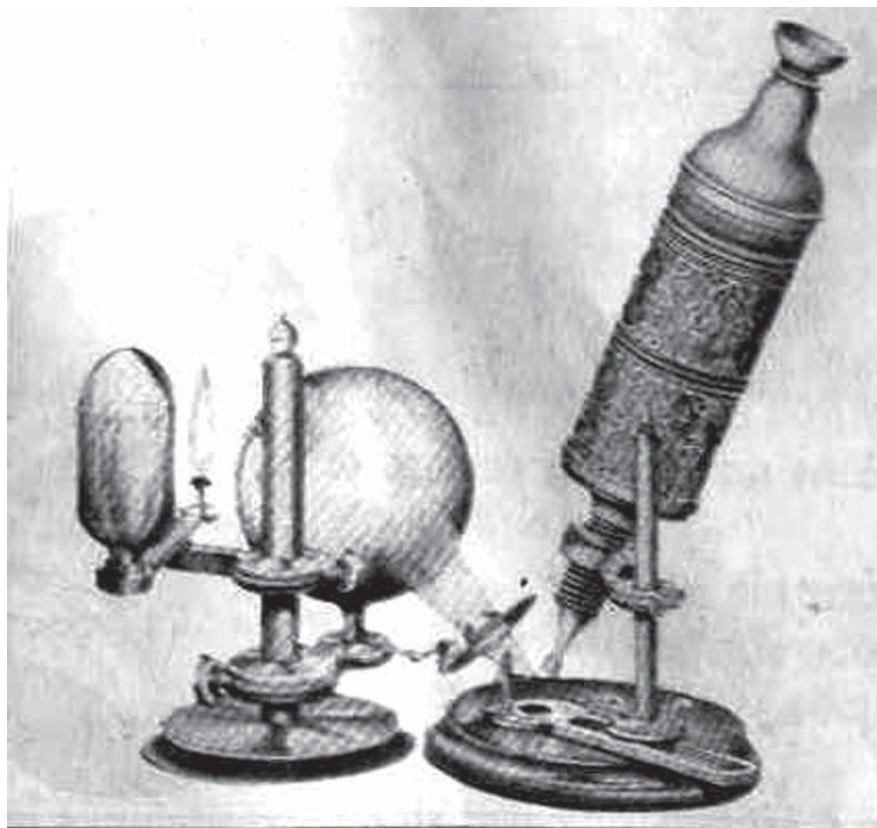
Fabiana Silva Vieira

INTRODUÇÃO

Olá, caro aluno! Seja bem-vindo a esta disciplina!

Neste nosso primeiro encontro, você entrará em contato com as primeiras informações sobre o microscópio óptico, conhecerá seus componentes e o funcionamento de cada um deles. Está preparado para começar? Então vamos lá.

Através das informações obtidas no site que indicamos para conhecer um pouco sobre a história do microscópio, temos certeza de que você já sabe como ocorreu a invenção deste aparelho. Deve ter percebido, também, a importância desta invenção para os avanços da Ciência e compreensão de um mundo que é limitado à visão humana.

(Fonte: http://www.cdcc.sc.usp.br).

O MICROSCÓPIO

A palavra microscópio vem do grego, mikrós e skoppéoo, que significam, respectivamente, "pequeno" e "observar". Este aparelho é uma das ferramentas básicas no estudo da Biologia. Através de um conjunto de lentes, o microscópio fornece imagens ampliadas de objetos pequenos, difíceis de serem examinados em detalhes a olho nu. Existem microscópios óticos ou de luz e eletrônicos. No microscópio ótico (MO), de que trataremos nesta aula, a imagem é formada a partir da iluminação do espécime com fótons. A luz que chega aos nossos olhos para formar a imagem atravessa primeiro o objeto em estudo. Por isso, o material biológico a ser observado não pode ser opaco, mas deve ser fino o suficiente para permitir a passagem da luz e, conseqüentemente, ser mais bem visualizado ao microscópio.

Esta aula está segmentada em três partes que, por sua vez, também estão subdivididas. Nesta primeira parte, caro aluno, você irá conhecer os componentes do sistema ótico e do sistema mecânico do MO.

MICROSCÓPIO ÓPTICO

É bem provável que você esteja curioso para conhecer as partes que compõem um microscópio ou, caso já tenha visto um, para revê-las ou aprofundar seus conhecimentos sobre elas. Então, vamos ao que nos interessa.

COMPONENTES

O microscópio ótico é constituído por um sistema mecânico que serve de suporte para o sistema ótico (as lentes) e inclui os elementos de focagem (Figura 1).

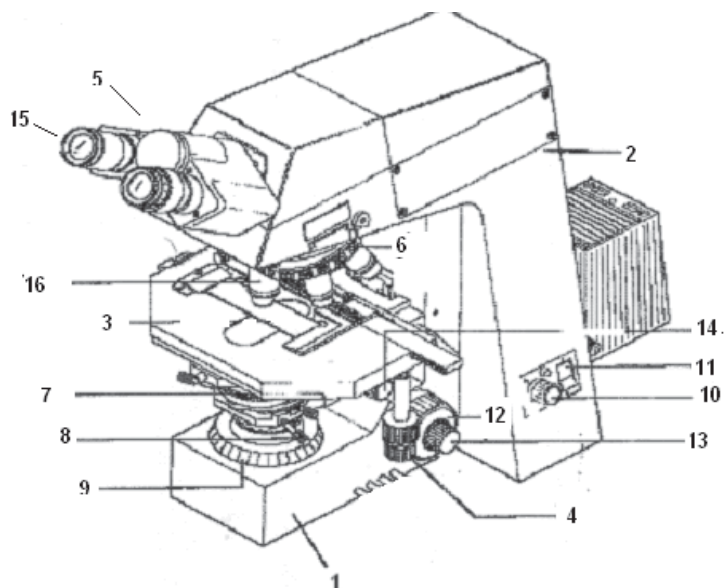



Figura 1 - Componentes do microscópio ótico (Fonte: Benchimol et al, 1996).

1. Pé ou base
2. Braço, estativo ou corpo
3. Platina ou mesa contendo a lâmina
4. Charriot
5. Tubo ou canhão
6. Revólver
7. Diafragma do condensador
8. Trava para centrar a imagem do diafragma
9. Diafragma de campo
10. Regulagem da intensidade luminosa
11. Interruptor
12. Parafuso macrométrico
13. Parafuso micrométrico
14. Regulagem do condensador
15. Ocular
16. Objetiva

Acreditamos que há alguns alunos que já tiveram a oportunidade de conhecer um microscópio óptico. Não sabemos se este é exatamente o seu caso. Mesmo assim, consideramos que tenha achado importante visualizar cada um desses componentes.

Agora que você cumpriu esta primeira etapa, vamos passar à descrição da função de cada um deles. Depois da explicação, tente identificar estas estruturas no MO disponível em sala de aula, e lembre-se de que é importante compreender bem o conteúdo a seguir, pois será um bom começo para conseguir desenvolver um excelente trabalho durante o manuseio deste aparelho.

SISTEMA MECÂNICO

1. Pé ou base – sustenta o microscópio, assegurando a sua estabilidade.
2. Braço, corpo ou estativo – peça fixa à base, em que estão inseridas todas as outras partes constituintes do microscópio.
3. Platina ou mesa – peça circular, quadrada ou retangular, paralela à base, onde se coloca a preparação a observar, tendo no centro um orifício circular ou alongado que possibilita a passagem dos raios luminosos concentrados pelo condensador.
4. Charriot – através do auxílio de suas presilhas, o charriot permite fixar a lâmina sobre a platina e sua movimentação.
5. Tubo ou canhão – é a parte superior do microscópio que suporta os sistemas de lentes. Na sua extremidade superior localiza-se a ocular e na inferior estão o revólver e as objetivas.
6. Revólver – está localizado abaixo do canhão e nele estão inseridas as lentes objetivas.
7. Diafragma do condensador – controla a entrada de luz que atinge o orifício da platina.
8. Trava para centrar a imagem do diafragma.
9. Diafragma de campo – serve para controlar a intensidade luminosa e pode ser aberto ou fechado através do anel de controle.
10. Regulagem da intensidade luminosa – regula a intensidade da fonte de luz que será emitida sobre a amostra.
11. Interruptor – serve para ligar a fonte luminosa. Apoiada sobre o pé, existe uma fonte própria de luz emitida a partir de uma lâmpada com filamento de halogênio. Em alguns microscópios, há apenas um espelho para refletir a luz de uma fonte externa.
12. Parafuso macrométrico – na parte lateral do braço existem dois parafusos, geralmente encaixados um sobre o outro. O de maior diâmetro é o parafuso macrométrico e sua rotação é responsável por movimentos verticais da platina em relação à objetiva.
13. Parafuso micrométrico – sua rotação permite movimentar a lâmina que contém a amostra a ser observada.

SISTEMA ÓPTICO

Agora que já conhecemos o sistema mecânico do microscópio de luz, vamos ao seu sistema óptico, uma vez que esta é a parte mais interessante deste aparelho, pois nos permite penetrar num mundo de estruturas não visíveis a olho nu.

14. Condensadora – é um conjunto de lentes localizado abaixo da platina que concentra o feixe luminoso necessário para obtenção de uma iluminação uniforme sobre o objeto estudado. A regulagem do condensador permite a movimentação das lentes condensadoras, que devem ser mantidas na posição mais elevada para a obtenção de uma iluminação uniforme.

15. Oculares – no interior da ocular encontram-se diversas lentes: lente de campo, diafragma e ocular propriamente dita. Existem MO com uma ou duas oculares, que são designados uniloculares e binoculares, respectivamente.

Se o pesquisador que for utilizar o microscópio tiver miopia ou hipermetropia, não precisará usar óculos durante o manuseio deste aparelho, pois o MO faz as correções necessárias

16. Objetivas – são as lentes mais importantes do microscópio e geralmente se encontram em número de quatro. As objetivas de 4x (lê-se: quatro vezes) e 10x são de pequeno aumento; a de 40x é a de grande aumento a seco e a de 100x é conhecida como de imersão. Esta objetiva é a de maior aumento, usada com o óleo de imersão colocado entre a lâmina de vidro e a objetiva. O índice de **refração** entre o vidro e o ar é de respectivamente 1,52 e 1,00.

Ver glossário no final da Aula

Estas diferenças resultam na diminuição da qualidade da imagem, pois uma menor quantidade de luz participa da formação da imagem. O emprego do óleo de imersão minimiza este problema, uma vez que seu índice de refração é de 1,52, similar ao do vidro. Tal fato evita a dispersão dos raios luminosos quando atravessam o conjunto lâmina-óleo, permitindo a entrada de um grande cone de luz na objetiva e, conseqüentemente, fornece uma imagem com maior riqueza de detalhes. Abaixo estão exemplos de valores de índice de refração para alguns meios (Tabela 1).

Material	Índice de refração
Ar	1,00
Água	1,33
Glicerol	1,47
Óleo de imersão	1,52
Vidro	1,52

Tabela 1 - Valores do índice de refração para diferentes meios.

RECORDANDO...

Viajando de carro em um dia quente, é comum a gente se deparar com miragens. O que pensamos ser um espelho d´água lá adiante é apenas uma reflexão do céu e das nuvens que estão no horizonte. A água aparente (e ilusória) situa-se a uma distância de uns 300 metros, ou mais, do motorista. Só nessas distâncias é possível haver um desvio da luz passando de descendente a ascendente. Quando o carro se aproxima, a água misteriosamente desaparece, ao mesmo tempo em que outra surge um pouco adiante.

(Fonte: http://www.seara.ufc.br).

Toda objetiva tem uma escritura na parte externa indicando, entre outras coisas, o seu poder de ampliação (o primeiro número e em caracteres maiores) e **resolução** (Figura 2).

Para entender melhor, observe o exemplo a seguir.

Exemplo - A objetiva de 40x tem as seguintes especificações: 40x / 0.70 e 160/16, em que:

40x - significa o número de vezes que esta objetiva amplia o objeto, e o aumento final é o resultado do produto das ampliações individuais da ocular e da objetiva.

0.70 - é o valor da **abertura numérica (AN)**. Este assunto será aprofundado na próxima aula.

160 - é a distância em milímetros da rosca da objetiva até a ocular.

16 - é a espessura da **lamínula**, dada em milímetros, que deve ser usada para essa objetiva.

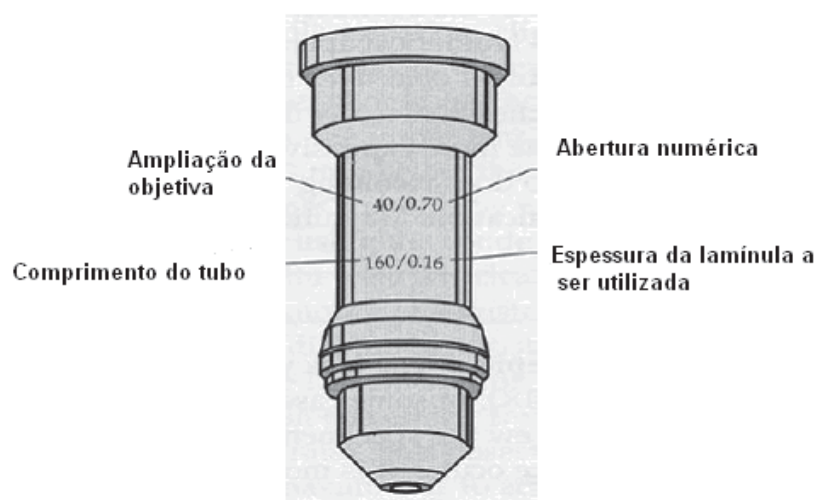



Figura 2 - Identificação das inscrições encontradas nas lentes objetivas.

TIPOS DE OBJETIVAS

Há vários tipos de objetivas que se diferenciam pela qualidade da imagem, correção das distorções da imagem (aberração) e preço.

Acromáticas - são as mais simples e baratas, pois não apresentam nenhuma sofisticação. Corrigem as aberrações no comprimento de onda do vermelho e do azul.

Semi-apocromáticas - são também chamadas de fluorita, porque este material entra na sua constituição e confere alguma correção para as aberrações.

Apocromáticas - têm correção ampla. Abrangem todo o espectro de luz.

Planacromáticas - corrigidas quanto à curvatura de campo, isto é, impedem a imagem curva de objetos planos.

Planapocromáticas - combinam as correções das apocromáticas com as da planacromáticas.

ABERRAÇÕES

Discutiumos, até o momento, a geração de imagens a partir de sistemas óticos ideais, que resultariam em uma imagem final perfeita e fiel ao espécime em observação. Na realidade, esta condição é muito difícil de ser conseguida devido ao formato esférico da lente, provocando aberrações na imagem. Basicamente, existem dois tipos de aberrações.

Cromáticas - resultado do desvio da direção dos raios luminosos que chegam ao objeto analisado.

A luz se comporta de diversas cores, e que os diferentes feixes de luz apresentam pontos focais diferenciados, ou seja, cada comprimento de

onda apresenta um ângulo de desvio diferente impedindo que as diversas cores atinjam o mesmo ponto do material (Figura 3).

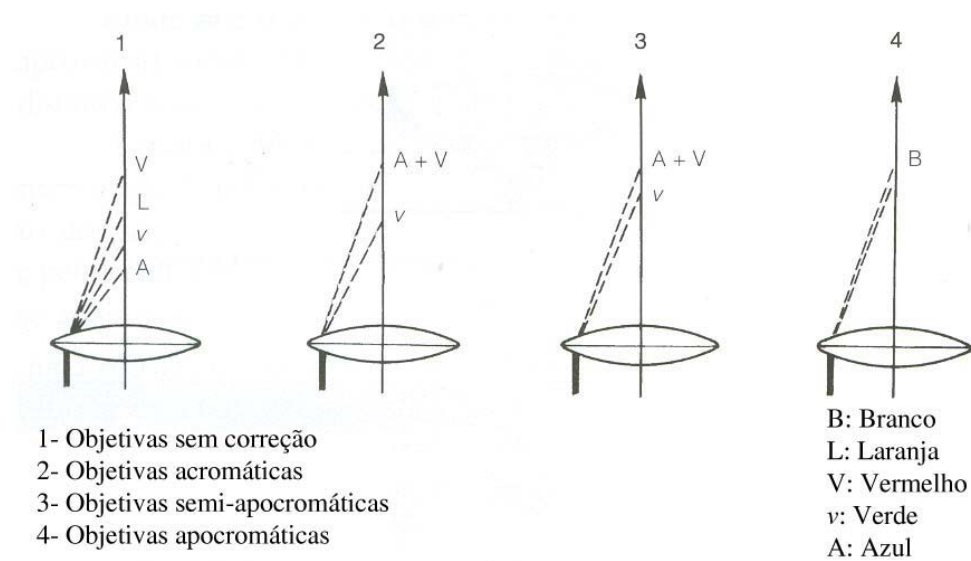



Figura 3 - Aberrações cromáticas. (Fonte: Leal, 2000).

Esféricas ou de curvatura de campo - os raios que incidem na região mais externa da lente tendem a focar antes dos raios que percorrem regiões mais centrais (Figura 4).

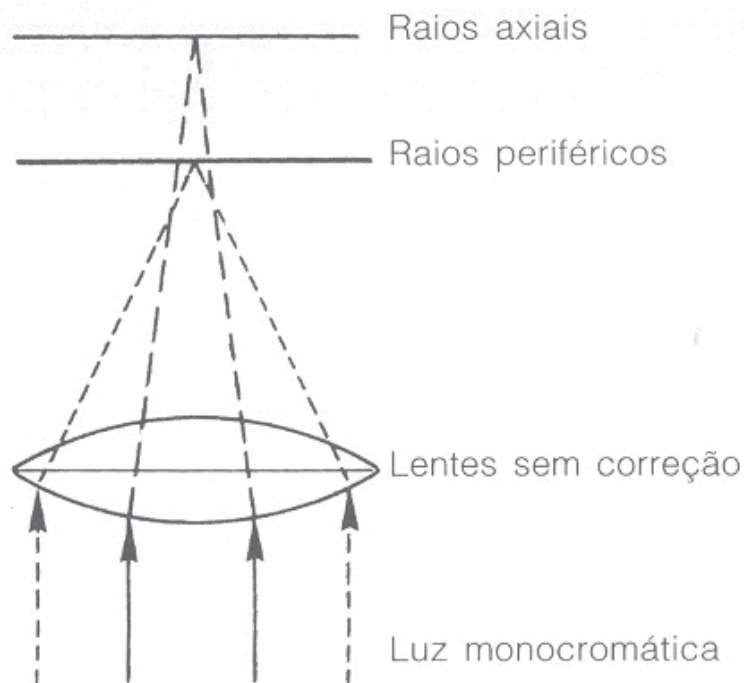



Figura 4 - Aberração esférica. Fonte: Leal, 2000.

CONCLUSÃO

Como verificamos nesta aula, o microscópio ótico permite a ampliação da imagem de um objeto pequeno. Como essa imagem é gerada por transparência, o material observado deve ser suficientemente fino para permitir a passagem da luz. Até o século XIX, era comum as imagens obtidas apresentarem distorções de acromatismo e esfericidade que, atualmente, foram corrigidas pela associação de lentes fabricadas com matérias especiais, como as acromáticas, semi-apocromáticas, apocromáticas, planacromáticas e planapocromáticas.

Este avanço na produção das lentes permite que as imagens atuais obtidas no MO sejam mais nítidas e pormenorizadas. A ampliação do material é obtida através da associação das lentes oculares e objetivas, suportadas por uma série de peças mecânicas que facilitam a focagem.

RESUMO

O microscópio é um aparelho indicado para visualização de estruturas minúsculas e é formado por componentes mecânicos e óticos. A estrutura mecânica é constituída pelas seguintes partes: base, braço, charriot, canhão, revólver, platina, diafragma do condensador e diafragma de campo, parafuso macrométrico e parafuso micrométrico. Essa estrutura serve para manter a estabilidade do MO, facilitar o seu manuseio e auxiliar na focagem. A parte ótica é composta pelas lentes condensadoras, oculares e objetivas, responsáveis pela formação da imagem. A lente condensadora promove a iluminação necessária para a formação da imagem; a objetiva fornece uma imagem real e aumentada do objeto em observação; enquanto a ocular funciona como uma lupa que nos proporciona uma imagem virtual e aumentada da imagem real formada pela objetiva. O potencial de aumento promovido pelo microscópio é resultado do produto da ampliação linear da objetiva pela potência da ocular. As aberrações da imagem são inerentes à curvatura da lente e estas distorções são corrigidas com a utilização de objetivas, como as acromáticas, semi-apocromáticas, apocromáticas, planacromáticas e planapocromáticas que garantem uma melhor visualização. A planapocromática, além de produzir a melhor imagem, é também a mais cara.

ATIVIDADES

1. Explique a importância do microscópio no estudo das células.
2. Diferencie o sistema ótico do mecânico.
3. Faça a correlação da primeira coluna com a segunda.

COLUNA I	COLUNA II
Ocular e objetiva	Deslocações de pequenas amplitudes
Ocular	Porta objetos
Base	Porta ocular
Condensadora	Deslocações de grande amplitude
Platina	Estabilidade do aparelho
Parafuso macrométrico	Sistema de lentes que amplia o objeto
Canhão	Lentes que projetam a imagem na retina
Parafuso micrométrico	Concentra os raios luminosos no objeto

4. Por qual motivo não se pode observar materiais muito espessos no microscópio ótico?

COMENTÁRIO SOBRE AS ATIVIDADES

1. Para responder a esta questão, você deve lembrar-se dos avanços científicos promovidos a partir do surgimento e melhoria desta técnica
2. Esta questão é bem simples, não acha? Se você conseguir respondê-la, significa que entendeu como o microscópio ótico está estruturado.
3. Esta atividade é para verificar seus conhecimentos sobre os constituintes do microscópio ótico.
4. É importante entender o princípio de geração da imagem através do microscópio ótico para responder este item.

PRÓXIMA AULA

Na próxima aula, daremos continuidade aos estudos sobre o microscópio ótico. Iremos abordar a importância da resolução ótica para o detalhamento dos espécimes observados. Além disso, você irá conhecer as diferentes modalidades de observação em microscopia ótica.

REFERÊNCIAS

BENCHIMOL, Marlene et al. **Métodos de estudo de célula.** Rio de Janeiro: Fenorte/UENF, 1996.
COOPER, Geoffrey M. **A célula**: uma abordagem molecular. 2 ed. São Paulo: Artmed, 2005.
DE ROBERTIS, Eduardo; HIB, José; PONZIO, Roberto. **Biologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.
JUNQUEIRA, Luiz Carlos Uchôa; CARNEIRO, José. Biologia celular e molecular. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.
LEAL, Luiz Henrique Monteiro. **Fundamentos de microscopia.** Rio de Janeiro: UERJ, 2000.
MELO, Rosana C. N. **Células e microscopia**: princípios básicos e práticas. Minas Gerais: EDUFJF, 2003.
VALLE, Francisco das Chagas. **Práticas de citologia e genética.** Rio de Janeiro: MEDSI, 2001.

GLÓSSARIO

Refração: A refração ocorre quando um feixe de luz que se propaga em um dado meio ótico passa a propagar-se em outro meio, mudando de direção.

Lamínula: Lâmina pequena utilizada para recobrir as preparações que serão observadas no microscópio.

Resolução: Distância mínima requerida entre dois objetos para que estes apareçam distintos.

Abertura numérica: Indica a capacidade de a lente objetiva concentrar luz.